

RESPOSTA DOS NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS DO DUODENO DE RATOS AO DIABETES DE CURTO PRAZO

Maria Montserrat Dias Pedrosa Furlan*
Sônia Lucy Molinari**
Marcílio Hubner Miranda-Neto***

FURLAN, M.M.D.P.; MOLINARI, S.L.; MIRANDA-NETO; M.H. Resposta dos neurônios mioentéricos do duodeno de ratos ao diabetes de curto prazo. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, Umuarama, 8(2), mai./ago. p.95-99, 2004.

RESUMO: Foram avaliados os neurônios mioentéricos do duodeno de ratos com diabetes de curto prazo induzido por estreptozotocina com e sem tratamento com insulina. A densidade de neurônios NADH diaforase positivos no duodeno dos ratos diabéticos aumentou em relação aos controles, indicando uma resposta neuronal precoce ao estado diabético. Por outro lado, a sub-população neuronal NADPH diaforase positiva não mostrou alterações significativas de densidade quando os grupos controle diabético não tratado e diabético tratado com insulina foram comparados, indicando que esses neurônios são resistentes ao diabetes de curto prazo. O tratamento com insulina melhorou a condição fisiológica dos ratos diabéticos tratados em comparação com o grupo diabético não tratado, mas não evitou o aumento na densidade neuronal, avaliada pela coloração com a NADH diaforase, no duodeno dos ratos diabéticos tratados comparados com os não tratados.

PALAVRAS-CHAVE: Diabetes. Duodeno. Neurônios mioentéricos. NADH diaforase. NADPH diaforase.

RESPONSE OF THE MYENTERIC NEURONS OF THE RAT DUODENAL TO SHORT-TERM DIABETES

FURLAN, M.M.D.P.; MOLINARI, S.L.; MIRANDA-NETO; M.H. Response of the myenteric neurons of the rat duodenal to short-term diabetes. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, Umuarama, 8(2), mai./ago. p.95-99, 2004.

ABSTRACT: The myenteric neurons of the duodenal of rats with short-term streptozotocin-induced diabetes with or without insulin treatment were evaluated. The density of positive NADH diaphorase neurons in the diabetic rat duodenal increased concerning the controls, indicating an early neuronal response to the diabetic state. On the other hand, the positive NADPH diaphorase neuronal subpopulation did not exhibit significant alterations of density when the control, untreated diabetic and insulin-treated diabetic groups were compared, indicating that these neurons are resistant to short-term diabetes. Insulin treatment improved the physiological condition of the treated diabetic rats as compared to the untreated diabetic group, but it did not prevent the increase of the neuronal density of the duodenum, assessed by NADH diaphorase staining, in the treated concerning the untreated diabetic rats.

KEY-WORDS: Diabetes. Duodenal. Myenteric neurons. NADH diaphorase. NADPH diaphorase.

Introdução

O duodeno é a primeira porção do intestino que recebe o quimo parcialmente processado vindo do estômago. No duodeno, a digestão química acontece mediada pelas secreções lançadas nele pelo fígado e pâncreas. A presença do quimo no duodeno também controla o esvaziamento gástrico (KUTCHAI, 2000). Desse modo, o contato do quimo com a parede duodenal é o estímulo que desencadeia vias reflexas compostas de componentes neurais e hormonais que irão coordenar as atividades motoras e secretoras do estômago, fígado, pâncreas exócrino e do próprio duodeno (KUTCHAI, 2000). A integração perfeita dessas atividades para o desenrolar normal do processo digestório depende da integridade do Sistema Nervoso Entérico (SNE), intrínseco ao trato gastrointestinal e seus órgãos acessórios. Composto

de interneurônios, neurônios sensoriais e neurônios motores – os últimos sendo excitatórios ou inibitórios – e se estendendo ao longo de todo o trato digestório, o SNE é o regulador primário da atividade secretomotora do sistema digestório (GABELLA, 1979; KUTCHAI, 2000; STERNINI, 1988).

O SNE é bastante vulnerável a patologias debilitantes, como o diabetes mellitus. Na verdade, as alterações gastrointestinais estão entre as várias manifestações do diabetes não-controlado (ABRAHAMSSON, 1995; KARAKIDA *et al.*, 1989). Os neurônios mioentéricos do SNE, responsáveis pelo controle do músculo liso do tubo digestório, não escapam das debilidades causadas pela hiperglicemia. Em ratos cronicamente diabéticos, mudanças quantitativas e neuroquímicas dos neurônios mioentéricos em várias porções do tubo digestório foram relatadas (BALLMANN & CONLON, 1985; BELAI *et al.*, 1985,

*Professora Assistente, Departamento de Ciências Morfofisiológicas da Universidade Estadual de Maringá, Pr, Brasil.

**Professora Associada, Departamento de Ciências Morfofisiológicas da Universidade Estadual de Maringá, Pr, Brasil.

***Professor Titular, Departamento de Ciências Morfofisiológicas da Universidade Estadual de Maringá, Pr, Brasil

Endereço para correspondência: Maria Montserrat D. P. Furlan, Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Universidade Estadual de Maringá, Av Colombo, 5790 - Maringá, Pr, Brasil - 87020-900, Telefone (44) 261-4698, Fax (44) 261-4340, mmdpfurlan@uem.br

Trabalho resultante de pesquisa de doutorado de Maria Montserrat D. P. Furlan – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Universidade Estadual de Maringá, Pr, Brasil.

1988, 1996; FREGONESI *et al.*, 2001). Essas alterações na inervação gastrointestinal poderiam ser responsáveis pelo aparecimento de hipotonia, dilatação, gastroparesia, diarreia e constipação, frequentemente observados em pacientes diabéticos (CLARKE *et al.*, 1979).

Embora os sintomas gastrointestinais sejam um aspecto clinicamente tardio da neuropatia autonômica (CLARKE *et al.*, 1979), algumas alterações morfológicas e funcionais podem ser observadas precocemente (FURLAN *et al.*, 1999). Este trabalho investigou os neurônios mioentéricos do duodeno de ratos com diabetes experimental de curta duração com o objetivo de confirmar e estender os resultados previamente observados, bem como avaliar se o tratamento com insulina iria evitar a ocorrência de mudanças morfológicas e quantitativas nesses neurônios.

Material e método

O período experimental se estendeu por sete dias. Ratos Wistar machos com sete meses de idade foram aleatoriamente separados em grupos e colocados em gaiolas metabólicas individuais, onde foram mantidos com suprimento *ad libitum* de ração NUVITAL® para ratos e água. No primeiro dia do período experimental, após jejum noturno, os animais do grupo diabético não tratado (grupo D) e do grupo diabético tratado com insulina (grupo I) foram injetados intravenosamente com estreptozotocina na dose de 35 mg/kg de peso corporal dissolvida em tampão citrato, pH 4,5. O grupo controle (C) recebeu apenas veículo. O grupo I recebeu injeções subcutâneas diárias de insulina NPH (Novolin N, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca, 10 U/kg de peso corporal) aplicadas pela manhã, exceto no dia anterior ao sacrifício. Durante o período de sete dias, a ingestão diária de alimento e água e o débito urinário de todos os animais foram registrados e no último dia os ratos foram pesados e submetidos a jejum noturno.

Os ratos foram mortos por deslocamento cervical. O sangue foi coletado para avaliação do nível plasmático de glicose de jejum. O peso somado das gorduras retroperitoneal e periepídidimal direitas foi registrado e tomado como indicativo da massa corporal gorda. O duodeno foi removido, mensurado, e preparado de acordo com a técnica de coloração a ser empregada. Em resumo, as amostras destinadas à histoquímica da NADH diaforase (NADHd) foram lavadas e distendidas com solução de Krebs, pH 7,3, e processadas para a evidência neuronal (GABELLA, 1987) com tempo de incubação fixado em 45 minutos (FREGONESI *et al.*, 2001; FURLAN *et al.*, 1999). As outras amostras foram lavadas e distendidas com tampão fosfato salinado (PBS) 0,01M, pH 7,4, fixadas em paraformaldeído a 4% por 30 minutos e submetidas à histoquímica da NADPH diaforase (NADPHd) para neurônios que contêm óxido nítrico sintase (NOS) (SCHERER-SINGLER *et al.*, 1983). A coloração neuronal com NADPH foi visualmente acompanhada e interrompida após 150 minutos, quando uma coloração conspícua foi obtida. Os mesmos tempos de incubação foram empregados a todas as amostras. Intervalos maiores também foram testados, mas resultaram em coloração inespecífica que prejudicava a visualização dos neurônios mioentéricos corados. Após os procedimentos para evidência neuronal,

todos os segmentos foram imersos nos fixadores apropriados por pelo menos 48 horas.

A microdissecção da mucosa e da submucosa de anéis duodenais resultou em preparados de membrana, que foram preparados para observação ao microscópio óptico. Os neurônios mioentéricos foram contados sob objetiva de 40X. Todos os neurônios corados de 80 campos microscópicos (área total de 17,68 mm²) em cada preparado de membrana foram contados; neurônios parcialmente visíveis foram contados em campos alternados. Os 80 campos foram igualmente distribuídos nas regiões antimesentérica e intermediária da circunferência intestinal.

Os conjuntos de dados obtidos foram estatisticamente avaliados por ANOVA unidirecional com pós-teste de Tukey ao nível de significância de 5%. Os dados são apresentados como média ± SEM.

Resultados

A injeção de veículo não teve qualquer efeito sobre os ratos do grupo C, quando comparados com ratos controles não injetados (dados não mostrados). O grupo controle, em média, não mostrou quaisquer mudanças significativas de peso, enquanto que durante sua manutenção nas gaiolas metabólicas todos os animais diabéticos (grupos D e I) perderam peso. Contudo, a perda de peso foi mais pronunciada nos diabéticos não tratados, que também tiveram aumentos marcantes na ingestão de água e no débito urinário e um ligeiro, mas não significativo, aumento na ingestão de alimento. Os animais do grupo D também estavam mais agressivos do que os outros durante sua manipulação. O tratamento com insulina (grupo I) melhorou não apenas o comportamento dos ratos do grupo I durante o período experimental, mas também tendeu a trazer sua ingestão de água e alimento e seu débito urinário em direção aos valores controles. O nível plasmático da glicose de jejum não diferiu entre os grupos D e I, uma observação que será discutida mais tarde. Todos esses dados são apresentados na Tabela 1.

Ao microscópio, os preparados de membrana corados com NADHd mostraram agrupamentos neuronais pouco compactos. De modo semelhante, os preparados de membrana corados com NADPHd tinham espaços nos gânglios mioentéricos, provavelmente ocupados por neurônios NADPHd negativos. Como essa técnica também corou as fibras do plexo mioentérico, foi possível visualizar sua organização, especialmente o trajeto dos conectivos primários e secundários.

A área duodenal, calculada a partir de suas medidas de comprimento e circunferência, foi de 12,34 ± 0,96 cm² no grupo C, 10,85 ± 0,67 cm² no grupo D e 12,61 ± 0,95 cm² no grupo I (p>0,05). Contudo, os neurônios NADHd positivos contados em 80 campos foram acentuadamente mais numerosos nos grupos D e I quando comparados ao grupo C (p<0,05), enquanto os neurônios NADPHd positivos não sofreram mudanças numéricas entre os grupos (p>0,05). As contagens neuronais são apresentadas na Tabela 2.

Discussão

Os sinais patofisiológicos do diabetes induzido

Tabela 1. Variação de peso, alimento e água ingeridos, volume urinário, nível plasmático de glicose e peso das gorduras em ratos dos grupos controle (C), diabético não tratado (D) e diabético tratado (I). n = número de ratos.

	Grupo C (n=10)	Grupo D (n=8)	Grupo I (n=8)
Varição de peso (%)	-0,36 ± 1,17	-14,78 ± 0,82 ^A	-6,78 ± 1,16 ^A
Alimento ingerido (g/100 g peso corporal)	6,51 ± 0,30	7,30 ± 0,61	6,32 ± 0,36
Água ingerida (ml/100 g peso corporal)	11,79 ± 0,90	22,06 ± 1,51 ^A	16,68 ± 0,79 ^{BC}
Volume urinário (ml/100 g peso corporal)	1,02 ± 0,09	9,12 ± 0,61 ^A	4,34 ± 0,55 ^A
Nível plasmático de glicose (mmol/l)	6,30 ± 0,70	13,40 ± 1,00 ^A	13,10 ± 2,20 ^A
Gorduras (g/100 g peso corporal)	1,75 ± 0,26	1,34 ± 0,20	1,42 ± 0,14

^Ap<0,01 em relação ao grupo C^Bp<0,05 em relação ao grupo C^Cp<0,01 em relação ao grupo D**Tabela 2. Número de neurônios mioentéricos NADHd e NADPHd positivos em 17,68 mm² de duodeno nos grupos controle (C), diabético não tratado (D) e diabético tratado (I). n = número de ratos.**

técnica	n	grupo	número de neurônios
NADH diaforase	6	Controle	740,80 ± 140,00
	4	Diabético não tratado	1396,00 ± 153,80 ^A
	4	Diabético tratado	1448,00 ± 220,70 ^A
NADPH diaforase	4	Controle	900,50 ± 26,49
	4	Diabético não tratado	856,00 ± 37,96
	4	Diabético tratado	937,80 ± 73,41

^Ap<0,05 em relação ao grupo C

por estreptozotocina surgem muito cedo. Poucas horas após a injeção da droga, são observadas mudanças no nível plasmático de glicose e nos níveis séricos e pancreáticos de insulina (JUNOD *et al.*, 1969), bem como na aparência das ilhotas pancreáticas (JUNOD *et al.*, 1967; PAPPACCIO & ESPOSITO, 1992). A observação dos grupos diabéticos deste estudo (grupos D e I) confirma que a estreptozotocina leva rapidamente ao aparecimento de sintomas característicos do diabetes (perda de peso corporal, ingestão excessiva de água e grande débito urinário) que resultam, basicamente, das alterações no metabolismo orgânico causadas pela ausência/insuficiência da insulina e das alterações no funcionamento celular e tecidual devidas à hiperglicemia (CRAWFORD & COTRAN, 1996). Por outro lado, os animais diabéticos que foram tratados com insulina (grupo I) mostraram uma melhora geral em seu perfil fisiológico, com uma perda de peso menos pronunciada, e ingestão de água e débito urinário menores do que os ratos diabéticos não tratados (grupo D). Desse modo, o regime de insulina administrado aos animais, embora não mantivesse os ratos na condição controle, realmente os colocou em uma condição menos debilitante, do ponto de vista fisiológico, do que o diabetes não controlado.

A hiperfagia é também um aspecto característico do diabetes mellitus (CRAWFORD & COTRAN, 1996). É uma resposta comportamental à privação de glicose a que a maioria das células corporais está sujeita na ausência de insulina. Essa resposta não mostrou significância neste estudo, e a explicação pode ser múltipla. Primeiro, os ratos usados eram animais completamente desenvolvidos, com estado nutricional e condição de saúde satisfatórios

no início do experimento. Indivíduos diabéticos idosos também não têm a hiperfagia como sintoma obrigatório de diabetes mellitus (SINGH & MARSHALL, 1995). Segundo, o período de uma semana pode ter sido muito curto para essa mudança comportamental se tornar significativa. Terceiro, a provável deficiência incompleta de insulina (refletida na hiperglicemia moderada) pode ter mantido algum fornecimento de glicose para as células, contornando assim a necessidade de hiperfagia marcante. Mesmo assim, a ligeira – mas não significativa estatisticamente – elevação na ingestão de alimento observada no grupo D foi evitada nos ratos diabéticos tratados com insulina (Tabela 1).

O peso das gorduras não diferiu estatisticamente entre os grupos. Entretanto, é visível que os valores do grupo I são intermediários aqueles dos grupos C e D. Portanto, pode ser especulado que: a) o diabetes não controlado (grupo D) mobilizou a massa corporal de modo que substratos energéticos fossem supridos para as células carentes de glicose e para as vias gliconeogênicas (GENUTH, 2000). Isso foi suficiente para causar perda de peso corporal neste grupo, mas não foi suficiente para esgotar significativamente os estoques de gordura após uma semana; b) o tratamento com insulina (grupo I) foi capaz de, ao menos parcialmente, prevenir a mobilização de gordura e a perda de peso corporal, uma vez que a insulina é um hormônio essencialmente anabólico (CRAWFORD & COTRAN, 1996; GENUTH, 2000). É também possível que as vias lipolíticas e gliconeogênicas tenham sensibilidades diferentes à insulina, da mesma forma que acontece com a gliconeogênese e a glicogenólise (BURCELIN *et al.*, 1995).

Os níveis plasmáticos de glicose apresentados

na Tabela 1 são semelhantes entre os grupos D e I. Esses valores foram obtidos pouco antes do sacrifício, após jejum noturno. Na manhã anterior, os ratos do grupo I não receberam insulina, uma vez que o jejum, que iria coincidir com o momento de maior atividade da insulina injetada, iria ameaçar a sobrevivência dos animais devido à hipoglicemia severa. Observações prévias em nosso laboratório mostraram que, em animais alimentados, os níveis plasmáticos de glicose estavam essencialmente normais cerca de sete/dez horas após a injeção de insulina. Essas observações ajudaram a assegurar que a insulina estava promovendo o efeito desejado, e permaneceu assim por várias horas após sua aplicação. O valor da glicose plasmática do grupo I apresentado na Tabela 1 reflete, portanto um momento do metabolismo do animal em que ele estava virtualmente desprovido de atividade insulínica exógena, e estava tão hiperglicêmico quanto um animal diabético não tratado. Essa mesma observação foi relatada anteriormente (KARAKIDA *et al.*, 1989).

Recentemente, o óxido nítrico (NO), sintetizado pelos neurônios mioentéricos, foi reunido ao VIP e ao ATP como neurotransmissor inibitório para o músculo liso do tubo digestório (BELAI *et al.*, 1992). A inibição do músculo liso gastrointestinal é essencial para a progressão das ondas peristálticas e para o controle da passagem dos conteúdos luminiais de um segmento do tubo digestório para outro (COSTA & BROOKES, 1994; KUTCHAI, 2000).

Os neurônios que sintetizam NO, tanto no sistema nervoso central quanto no periférico, podem ser visualizados pelo emprego da histoquímica da NADPHd (BELAI *et al.*, 1992; DAWSON *et al.*, 1991; JOHNSON *et al.*, 1998) e compõem uma fração significativa da população mioentérica total em qualquer segmento do tubo digestório. Em relação à população mioentérica total (corada por Giemsa) (FURLAN *et al.*, 1999), a sub-população NADPHd positiva no duodeno dos animais deste estudo alcançou 24,9%, uma proporção semelhante àquela encontrada no íleo de ratos (BELAI *et al.*, 1995) e no intestino delgado de humanos jovens (WESTER *et al.*, 1999). Além disso, a estrutura do plexo corado pela NADPHd foi semelhante àquela relatada em outras investigações (BELAI *et al.*, 1992; WESTER *et al.*, 1999), em que não apenas os corpos celulares dos neurônios mas também os feixes de fibras nervosas dos plexos intramurais eram claramente observados.

O número de neurônios mioentéricos NADPHd positivos não mudou após uma semana de diabetes não controlado. Tem sido relatado que os neurônios NO/NADPHd positivos são resistentes ao envelhecimento e a ameaças ambientais, tais como excitotoxicidade, hipóxia, e doença de Huntington (DAWSON *et al.*, 1991; JOHNSON *et al.*, 1998; BELAI *et al.*, 1995). Neste trabalho foi demonstrado que, ao menos a curto prazo, esses neurônios, no duodeno, são também resistentes ao diabetes. No estômago, mostrou-se que a densidade de neurônios NOS positivos e a atividade motora dependente de NO estavam reduzidas em roedores com diabetes crônico (JENKINSON & REID, 2000; WRZOS *et al.*, 1997).

Um cenário diferente surge no que concerne os neurônios NADHd positivos do plexo mioentérico duodenal. De modo semelhante ao que foi encontrado anteriormente (FURLAN *et al.*, 1999), a densidade neuronal observada no

grupo D foi muito maior do que no grupo C (veja a Tabela 2). Como o duodeno de ambos os grupos teve tamanhos semelhantes, isso exclui a possibilidade de que uma área reduzida tenha aumentado a densidade neuronal no grupo D. Portanto, houve realmente uma coloração neuronal maior pela NADHd nos animais diabéticos. No colo proximal, o diabetes de curto prazo causou uma resposta diferente, i.e., o número de neurônios NADHd positivos diminuiu (FURLAN *et al.*, 2002).

A técnica da NADHd é inespecífica, pelo menos no que se refere ao fenótipo neurotransmissor dos neurônios corados: o termo NADH diaforase é genericamente aplicado a enzimas capazes de oxidar NADH na presença de um aceptor artificial de elétrons (DORLAND, 1994), como os sais de tetrazólio. Embora a ligação entre mudanças no número de neurônios NADHd positivos e mudanças metabólicas neuronais necessite de ensaios bioquímicos, o aumento na densidade de neurônios NADHd positivos no duodeno do grupo D sugere que a condição diabética, seja por causa da hiperglicemia seja pela insulinopenia, ou uma combinação de ambas, alterou o metabolismo neuronal, tornando um grupo maior de neurônios mioentéricos reativos à técnica nas condições de incubação empregadas. Isso pode ser uma resposta transitória e decréscimos na densidade de neurônios mioentéricos em condições de diabetes crônico foram relatados ao longo de todo o tubo digestório (BUTTOW *et al.*, 1997; FREGONESI *et al.*, 2001; ZANONI *et al.*, 1997).

O tratamento com insulina não mudou a densidade de neurônios NADPHd positivos nos ratos tratados em relação aos outros grupos. Anteriormente, foi relatado que a insulina é capaz de restaurar o padrão dos neurônios e fibras imunorreativos a VIP, galanina e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) no íleo do rato diabético (BELAI *et al.*, 1996). As fibras de substância P não sofrem mudanças no tubo digestório de animais diabéticos, e o tratamento com insulina, nesse caso, não tem influência sobre elas (BELAI *et al.*, 1985, 1996). Esta última observação corresponde àquela descrita aqui para os neurônios mioentéricos NADPHd positivos.

Conclusão

Não foram encontrados dados para sustentar uma debilidade precoce dos neurônios duodenais NADPHd positivos no diabetes mellitus. Por outro lado, o aumento na densidade de neurônios NADHd positivos indicou que, funcionalmente, a população neuronal mioentérica estava respondendo à condição diabética com alterações metabólicas generalizadas, que não foram completamente contornadas pelo tratamento com insulina, embora a insulina fosse capaz de melhorar o bem-estar dos animais diabéticos tratados.

Agradecimentos

Os autores agradecem à assistência técnica de M. A. Agostinho, J. A. de Souza and V. Trombelli.

Referências bibliográficas

ABRAHAMSSON, H. Gastrointestinal motility disorders in patients with

- diabetes mellitus. *J. Intern. Med.* v. 237, p. 403-409, 1995.
- BALLMANN, M.; CONLON, J. M. Changes in the somatostatin, substance P and vasoactive intestinal polypeptide content of the gastrointestinal tract following streptozotocin-induced diabetes in the rat. *Diabetologia*, v. 28, p. 355-358, 1985.
- BELAI, A. et al. Enteric nerves in diabetic rats: increase in vasoactive intestinal polypeptide but not substance P. *Gastroenterology*, v. 89, p. 967-976, 1985.
- _____. Progressive changes in adrenergic, serotonergic, and peptidergic nerves in proximal colon of streptozotocin-diabetic rats. *Gastroenterology*, v. 95, p. 1234-1241, 1988.
- _____. Colocalization of nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase in the myoenteric plexus of the rat gut. *Neurosci. Lett.* v. 143, p. 60-64, 1992.
- BELAI, A.; COOPER, S.; BURNSTOCK, G. Effect of age on NADPH-diaphorase-containing myoenteric neurons of rat ileum and proximal colon. *Cell Tissue Res.* v. 279, p. 379-383, 1995.
- BELAI, A. et al. Enteric neuropeptides in streptozotocin-diabetic rats; effects of insulin and aldose reductase inhibition. *J. Auton. Nerv. Syst.* v. 58, p. 163-169, 1996.
- BURCELIN, R. et al. Excessive glucose production, rather than insulin resistance, accounts for hyperglycaemia in recent-onset streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia*, v. 38, p. 283-290, 1995.
- BUTTOW, N. C.; MIRANDA NETO, M. H.; BAZOTTE, R. B. Morphological and quantitative study of the myoenteric plexus of the duodenum of streptozotocin-induced diabetic rats. *Arq. Gastroenterol.* v. 34, p. 34-42, 1997.
- CLARKE, B. F.; EWING, D. J.; CAMPBELL, I. W. Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetologia*, v. 17, p. 195-212, 1979.
- COSTA, M.; BROOKES, S. J. H. The enteric nervous system. *Am. J. Gastroenterol.* v. 89, p.129-137, 1994.
- CRAWFORD, J. M.; COTRAN, R. S. Pâncreas. In: _____. *Patologia estrutural e funcional*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 806-833.
- DAWSON, T. M. et al. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 88, p. 7797-7801, 1991.
- DORLAND, W. A. N. *Dorland's illustrated medical dictionary*. Philadelphia: W. B. Saunders, 1994.
- FREGONESI, C. E. P. T. et al. Quantitative study of the myoenteric plexus of the stomach of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Arq. Neuropsiquiatria*, v. 59, p. 50-53, 2001.
- FURLAN, M. M. D. P. et al. Number and size of myoenteric neurons of the duodenum of adult rats with acute diabetes. *Arq. Neuropsiquiatria*, v. 57, p. 740-745, 1999.
- _____. Morphoquantitative effects of acute diabetes on the myoenteric neurons of the proximal colon of adult rats. *Arq. Neuropsiquiatria*, v. 60, p. 576-581, 2002.
- GABELLA, G. Innervation of the gastrointestinal tract. *Int. Rev. Cytol.* v. 59, p. 129-193, 1979.
- _____. The number of neurons in the small intestine of mice, guinea-pigs and sheep. *Neuroscience*, v. 22, p. 737-752, 1987.
- GENUTH, S. Hormônios das ilhotas pancreáticas. In: BERNE, R. M.; LEVY, M. N. *Fisiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 774-797.
- JENKINSON, K. M.; REID, J. J. Altered non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission in gastric fundus from streptozotocin-diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.* v. 401, p. 251-258, 2000.
- JOHNSON, R. J. R. et al. The effects of age on the overall population and on sub-populations of myoenteric neurons in the rat small intestine. *J. Anat.* v. 192, p. 479-488, 1998.
- JUNOD, A. et al. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* v. 126, p. 201-205, 1967.
- JUNOD, A. et al. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J. Clin. Invest.* v. 48, p. 2129-2139, 1969.
- KARAKIDA, T.; ITO, S.; HOMMA, S. In vitro motor activity of intestinal segments of streptozotocin diabetic rats. *J. Auton. Nervous Syst.* v. 26, p. 43-50, 1989.
- KUTCHAI, H. C. Motilidade gastrointestinal. In: BERNE, R. M.; LEVY, M. N. *Fisiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 555-580.
- PAPPACCIO, G.; ESPOSITO, V. Ultrastructural observations on cytotoxic effector cells infiltrating pancreatic islets of low-dose streptozotocin treated mice. *Virchows Archiv. A. Pathol. Anat.* v. 420, p. 5-10, 1992.
- SCHERER-SINGLER, U. et al. Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. *J. Neurosci. Method.* v. 9, p. 229-234, 1983.
- SINGH, I.; MARSHALL, M. C. Diabetes mellitus in the elderly. *Endocr. Met. Clin. North Am.* v. 24, p. 255-272, 1995.
- STERNINI, C. Structural and chemical organization of the myoenteric plexus. *Ann. Rev. Physiol.* v. 50, p. 81-93, 1988.
- WESTER, T.; O'BRIAIN, D. S.; PURI, P. Notable postnatal alterations in the myoenteric plexus of normal human bowel. *Gut*, v. 44, p. 666-674, 1999.
- WRZOS, H. F. et al. Nitric oxide synthase (NOS) expression in the myoenteric plexus of streptozotocin-diabetic rats. *Dig. Dis. Sci.* v. 42, p. 2106-2110, 1997.
- ZANONI, J. N. et al. Morphological and quantitative analysis of the neurons of the myoenteric plexus of the cecum of streptozotocin-induced diabetic rats. *Arq. Neuropsiquiatria*, v. 55, p. 696-702, 1997.

Recebido para publicação em: 12/03/2004

Received for publication on: 12/03/2004

Aceito para publicação em: 11/07/2004

Accepted for publication on: 11/07/2004

Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agricultura

Recomendado pela CAPES



0000

• **Área de Concentração:**

Biotecnologia Aplicada à Agricultura

• **Linhas de Pesquisa:**

Biotecnologia Aplicada a Microbiologia Agrícola;
Biotecnologia Aplicada ao Melhoramento Vegetal;
Coleta, Caracterização e Conservação de Germoplasma.

• **Inscrições Para Exame de Seleção:**

3 de abril a 9 de junho de 2006.

• **Processo Seletivo:**

O processo seletivo constará de

1- Avaliação do *Curriculum Vitae* (modelo Lattes/CNPq) e do histórico escolar da graduação;

2- Prova subjetiva de conhecimentos básicos em Biotecnologia Aplicada à Agricultura – bibliografia disponível na página www.unipar.br;

A prova subjetiva será realizada no dia 23 de junho de 2006 das 9h às 12h em que serão apresentados os temas referentes às áreas de Microbiologia, Genética e Biodiversidade. O aluno deverá discorrer sobre apenas um tema de uma das áreas.

3- Entrevista perante Comissão de Seleção, constituída por docentes orientadores do Curso.

A entrevista será realizada no dia 23 de junho de 2006 a partir das 14h.

Os critérios de seleção e locais da prova subjetiva e da entrevista estarão disponíveis na página www.unipar.br

• **Matrícula**

Data: 14 e 15 de julho de 2006.

Local: Secretaria de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da UNIPAR Umuarama (Sede)

Horário: das 9h às 17h.

• **Informações:**

www.unipar.br

Secretaria de Pós-Graduação *Stricto Sensu*

da UNIPAR-Umuarama (Sede)

Horário: das 09 às 18 horas,

de segunda à sábado

(44) 3621.2885

e-mail: mtdbiotecnologia@unipar.br

